

## SHORT COMMUNICATION

**Isolierung und Zählung von Bodenactinomyceten auf  
Erdplatten mit Membranfiltern***(With a summary)*

Seit der Entdeckung der Antibioticabildung durch Actinomyceten sind zahlreiche Verfahren für ihre Anreicherung und Isolierung beschrieben worden <sup>4</sup>. Eine Anreicherung wird häufig durch die Zugabe selektiv wirkender Stoffe zum Boden, die Schaffung besonders günstiger ökologischer Bedingungen oder den Zusatz von Substanzen, die auf andere Organismen hemmend wirken, vorgenommen. Wenn Inhibitoren verwendet werden, besteht jedoch die Möglichkeit, daß ebenfalls bestimmte empfindliche Actinomyceten im Wachstum beeinträchtigt werden. Deshalb wäre ein Verfahren anzustreben, das eine einfache räumliche Abtrennung der Actinomyceten von anderen Organismen bewirkt, ohne zunächst durch zu spezifische Ernährungs- und Umweltbedingungen das Mikroorganismenspektrum einzuengen. In einer früheren Arbeit <sup>5</sup> wurde bereits festgestellt, daß ein Teil der Bodenactinomyceten Membranfilter von bestimmter Porenweite innerhalb von 6 Tagen makroskopisch sichtbar durchwächst, während gleichzeitig anwesende Bakterien zurückgehalten werden. An diese Beobachtung knüpfen die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen an.

*Methodik*

Die Zählung und Isolierung der Actinomyceten erfolgte nach vorheriger Verdünnung der Bodenprobe in sterilem aqua dest. Für den verwendeten humosen Sandboden erwies sich die Verdünnungsstufe 1:10<sup>-5</sup> als geeignet. Von dieser Verdünnung wurden je 1 ml durch sterile Membranfilter von 50 mm Durchmesser und 0,3 Mikron mittlerer Porenweite filtriert und die Filter verschiedenen Actinomycetennährböden zur Bebrütung aufgelegt. Daneben sind von der gleichen Bodenverdünnung Zählungen nach dem Plattengußverfahren vorgenommen worden. Die verwendeten ähnlich zusammengesetzten Medien haben folgende Zusammensetzung, (Sehe Seite 286).

Zum Teil wurde diesen Substraten noch 10% Komposterde zugesetzt. Das erdhaltige Substrat mußte vor dem Ausgießen in Petrischalen kräftig geschüttelt werden, um eine gleichmäßige Verteilung der Erdpartikel zu erreichen. Weitere Angaben über solche 'Erdplatten' finden sich an anderer Stelle <sup>5</sup>. Für das Plattengußverfahren kamen die Medien stets ohne Erdsatz zur Anwendung. Alle Bestimmungen der Actinomycetenzahl erfolgten mit je 5 Parallelen.

<i>Substrat I</i>			<i>Substrat II</i>		
KNO <sub>3</sub>	1	g	KNO <sub>3</sub>	2	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	g
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	1	g	MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,05	g
NaCl	0,5	g	NaCl	2	g
FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,018	g	FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,01	g
Stärke	20	g	Stärke	10	g
Agar	15	g	Casein	0,3	g
aqua dest.	1	l	Agar	15	g
			aqua dest.	1	l

### *Ergebnisse*

Zählung und Isolierung von Actinomyceten. Die Hälfte der Membranfilter wurde dem Nährboden 'normal' aufgelegt, so daß die sterile Seite des Filters das Substrat berührte. Die anderen Membranfilter wurden 'umgekehrt' aufgelegt, wobei die organismenbesetzte Seite dem Substrat zugewandt war. Im ersten Fall wuchsen neben Actinomyceten zahlreiche Bakterienkolonien auf der Filteroberfläche, während bei den umgekehrt aufgelegten

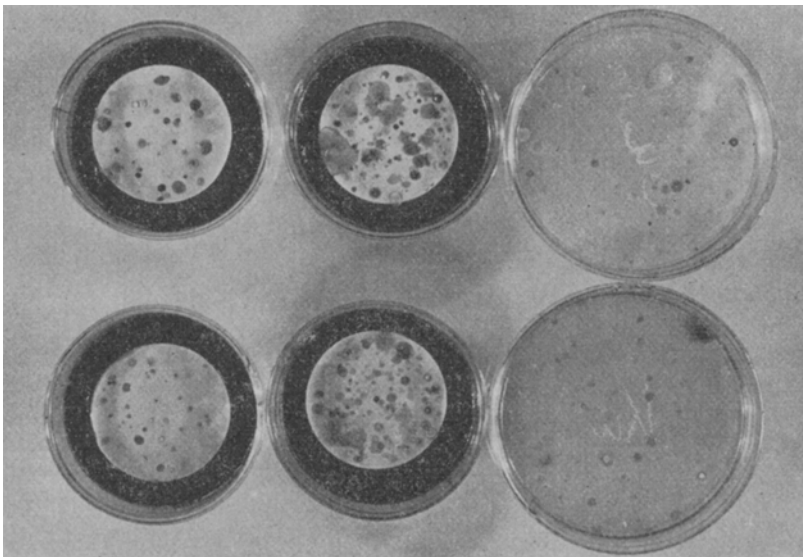


Abb. 1. *Obere Reihe links*: Membranfilter umgekehrt auf Substrat I + Erde aufgelegt. Es sind nur Actinomyceten gewachsen. *Mitte*: Membranfilter normal auf Substrat I + Erde aufgelegt. Neben Actinomyceten haben sich noch zahlreiche Bakterienkolonien entwickelt. *Rechts*: Plattenguß mit Substrat I. Es ist schlecht zwischen Actinomyceten und Bakterien zu unterscheiden. *Untere Reihe*, ebenso mit Substrat II.

Membranfiltern sich zunächst alle Kolonien zwischen Filter und Substrat entwickelten. Erst im weiteren Verlauf des Wachstums durchdrangen die Actinomyceten allmählich das Filter und bildeten auf der sterilen substratabgewandten Seite neue Kolonien. Die Bakterien wurde durch das Membranfilter zurückgehalten, so daß die Actinomyceten vollständig von den Bakterien getrennt waren (Abb. 1). Damit wurde ohne die Verwendung eines streng selek-

TAB. 1

		Substrat	Zahl der Actinomycetenkolonien je Platte
Membranfilter	normal aufgelegt	I + Erde	35,6
		II + Erde	39,8
	umgekehrt aufgelegt	I + Erde	36,6
		II + Erde	35,2
Plattenguß	I	25,4	
	II	21,6	

tiven Substrats und ohne den Zusatz von Antibiotica eine Abtrennung der Actinomyceten von den übrigen Mikroorganismen erreicht, so daß sich die Isolierung von den Oberflächenkolonien der bakterienfreien Seite leicht vornehmen ließ. Das unterschiedliche Auflegen der Filter hatte nach 13tägiger Bebrütung keinen Einfluß auf die Zahl der Actinomyceten (Tab. 1). Dagegen reicht eine kürzere Inkubation (6 Tage), wie sie in früheren Versuchen angewendet wurde<sup>5</sup>, für einige Actinomyceten zum Durchdringen des Filters offenbar nicht aus. Hinsichtlich ihrer Eignung für das Actinomycetenwachstum waren zwischen beiden Substraten keine Unterschiede festzustellen. Die Zugabe von Erde jedoch, die mit der Anwendung von Membranfiltern möglich wurde, förderte des Actinomycetenwachstum in beiden Substraten beträchtlich und intensivierte gleichzeitig ihre Pigmentierung. Wenn Membranfilter normal aufgelegt werden bilden Actinomyceten außerdem sehr bald Luftmycel, welches ihr Erkennen wesentlich erleichtert. Demzufolge genügt für die Auszählung solcher Membranfilter auf Erdplatten eine 6tägige Inkubation. Günstig ist außerdem das geringe Seitenwachstum der Actinomyceten auf Membranfiltern, wodurch sie sich bei steigender Koloniendichte gegenseitig wenig in ihrer Entwicklung hemmen. Demgegenüber wachsen Actinomyceten in Gußplatten um so langsamer, je mehr Kolonien sich in einer Platte befinden. Aus diesem Grunde und auch deshalb, weil sich die meisten Kolonien zunächst im Agar entwickeln, wird das Luftmycel später als auf Membranfiltern gebildet, so daß Gußplatten für die Auswertung mindestens die doppelte Bebrütungszeit erfordern.

Selektion bacteriostatisch wirksamer Actinomyceten. Da bei der Membranfilter-Methode die Organismen an einer (Filter)oberfläche wachsen, lassen sich, in Gegensatz zu Gußplatten, alle Kolonien gleichzeitig durch

Abstempeln übertragen. Die feste Konsistenz der Actinomyceten ermöglicht das Abstempeln auf verschiedene Weise:

1. Das bewachsene Filter wird mit Pinzetten kurz auf andere Nährböden aufgelegt.
2. Das Filter wird über einen Zylinder gespannt, der als Stempel dient und so das Wachstumsmuster durch Abdruck überimpft.
3. Anstelle des bewachsenen Membranfilters läßt sich, nach einer in der Literatur beschriebenen Methode<sup>3</sup>, Samt über einen Stempel ziehen. Der Samt wird mit der Oberfläche des Membranfilters in Berührung gebracht und anschließend das aufgenommene Muster auf andere Nährböden übertragen.

Das Abstempeln der Actinomyceten erfolgt zunächst auf einen Actinomycetenagar dann auf einen Bakterienagar und schließlich auf einen Bakterienagar, dem Testbakterien zugesetzt sind. Mit dem sterilen Bakterienagar wird überprüft, ob die Filteroberfläche bakterienfrei war. Wenn im Verlauf der Inkubation um die wachsenden Kolonien Hemmzonen sichtbar geworden sind, kann die Auslese der bacteriostatisch wirksamen Actinomyceten erfolgen. Sie sind wahlweise von den Testplatten oder den auf dem Actinomycetenagar wachsenden Kolonien zu isolieren.

#### *Summary*

A technique is described to separate actinomycetes from other microorganisms with membrane filters on soil plates. A measured quantity of soil dilution was passed through a membrane filter and the filter with the adhering organisms was placed upside down on a medium provided with soil. After an incubation period of two weeks all actinomycetes had penetrated the filter developing colonies on the sterile surface, whereas the other organisms were retained by the filter. By this procedure the counting and isolation of actinomycetes has been facilitated. The selection of bacteriostatic active forms is practicable by stamping the crowded filter on a medium that contains test bacteria.

G. TROLLDENIER

Eingegangen am 30. Januar, 1967

Landwirtsch. Forschungsanstalt  
Büntehof, Hannover-Kirchrode

#### *Literatur*

- 1 Gause, G. F., T. P. Preobraschenskaja, E. S. Kudrina, N. O. Blinow, J. D. Rjabowa u. M. A. Sweschnikowa, Zur Klassifizierung der Actinomyceten. VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena (1958).
- 2 Küster, E. u. S. T. Williams, Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature*, Lond. **202**, 928-929 (1964).
- 3 Lederberg, J. u. E. M. Lederberg, Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.* **63**, 399-406 (1952).
- 4 Nüesch, J., Isolierung und Selektionierung von Actinomyceten. *Zbl. Bakteriol. Abt. I, Supplementh. 1. Anreicherungskultur und Mutantenauslese*, S. 234-255 (1965).
- 5 Trolldenier, G., Über die Eignung Erde enthaltender Nährsubstrate zur Zählung und Isolierung von Bodenmikroorganismen auf Membranfiltern. *Zbl. Bakteriol. Abt. II* **120**, 496-508 (1966).